

**PROGESTERONREZEPTOREN IM ZYTOSOL UND IHRE
TRANSLOKATION IN DEN ZELLKERN
BEI MAMMAKARZINOMZELLEN**

PETER KURZ

1986

*Diss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Frauenklinik der Universität München
im Klinikum Großhadern
Direktor: Prof. Dr. H. Hepp

Progesteronrezeptoren im Zytosol und ihre
Translokation in den Zellkern
bei Mammakarzinomzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Kurz
aus
Zeilarn
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Eiermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Hepp

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.1986

Meinen Eltern
in Dankbarkeit und Liebe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Zur Geschichte der Steroidhormonrezeptoren.....	1
1.2. Grundlegendes Modell zur Biochemie der Steroidrezeptoren.....	2
1.3. Klinische Bedeutung der Steroidrezeptoren.....	3
2. Ziele dieser Arbeit.....	6
3. Beschreibung der angewandten Bestimmungsmethode für Steroidrezeptoren.....	7
3.1. Herstellung der benötigten Chemikalien.....	7
3.1.1. Homogenisationspuffer.....	7
3.1.2. Kernextraktionspuffer.....	7
3.1.3. Testlösung für Proteinbestimmung..	7
3.1.4. Dextran-Aktivkohlesuspension.....	7
3.2. Aufbereitung der Proben.....	8
3.2.1. Gewinnung des Zytosols.....	8
3.2.2. Gewinnung des Kernextraktes.....	8
3.2.3. Proteinbestimmung.....	9
3.3 DCC Assay.....	10
3.3.1. Herstellung der Verdünnungsreihen des Gestagens.....	11
3.3.1.1. 3H-R5020.....	11
3.3.1.1.1. Bestimmung der Konzentrationspunkte.....	12
3.3.1.2. R5020.....	13
3.3.2. Herstellung der Inkubationsgemische.....	13
3.3.3. Trennung von gebundenem und freiem Steroid.....	14

3.3.4. Messung der Radioaktivität.....	14
3.3.5. Berechnung der Konzentrationen aus den Zählraten.....	15
4. Mathematische Auswertung der Analysen..	15
4.1. Sättigungsanalyse.....	15
4.2. Scatchard Plot.....	17
5. Auswertung der erhaltenen Rezeptorkon- zentrationen.....	20
5.1. Progesteronrezeptor im Zytosol positiv, im Kern negativ.....	21
5.2. Progesteronrezeptor im Zytosol negativ, im Kern positiv.....	24
5.3. Progesteronrezeptor im zytosol positiv und im Kern positiv.....	26
6. Diskussion.....	29
7. Zusammenfassung.....	32
8. Literaturverzeichnis.....	33
9. Lebenslauf.....	38

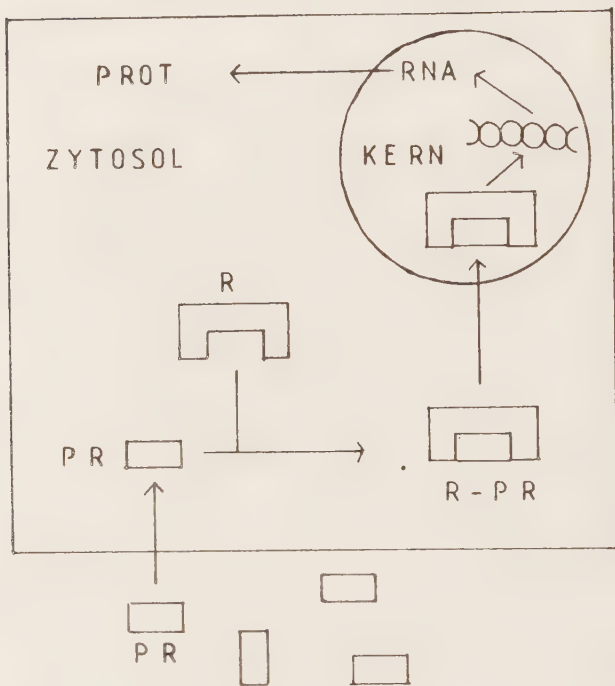
1. Einleitung

1.1. Zur Geschichte der Steroidhormonrezeptoren

1966 wurde zum ersten Mal ein Protein aus dem Uterus von Ratten isoliert, welches Östradiol mit hoher Affinität und Spezifität bindet (24). Bereits 7 Jahre zuvor war der Nachweis gelungen, daß ³H-markiertes Östradiol selektiv in sensitive Zellen aufgenommen wird (8), worauf man annahm, daß in diesen Zellen Moleküle vorhanden sein mußten, die das Hormon binden im Gegensatz zu Zellen aus Muskulatur oder Nieren, welche nicht in der Lage waren ³H-Östradiol anzureichern. 1967 schließlich stellte Jensen Vermutungen an, wonach rezeptorpositive Mammakarzinome mit bereits erfolgter Metastasierung häufiger auf eine endokrine Therapie ansprechen als rezeptornegative Tumoren (14). Für alle 5 Klassen von Steroidhormonen (Östrogene, Gestagene, Androgene, Glucocorticoide und Mineralocorticoide) wurden dann in den 70er Jahren entsprechende Rezeptoren nachgewiesen (3).

An der Frauenklinik des Klinikums Großhadern besteht seit August 1980 ein Einsendelabor zur Bestimmung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Mammakarzinomen. Bis heute wurde eine große Zahl von Mammakarzinomen bezüglich ihres Rezeptorstatus untersucht. Die auf Grund dieser Analysen erfolgte endokrine Therapie ist heute weitgehend in der Behandlung primär operierter, rezeptorpositiver metastasierter Mammakarzinome etabliert.

1.2. Grundlegendes Modell zur Biochemie der Steroidrezeptoren



PR = Progesteron; R = Rezeptor;
PROT = Protein

Abb 1 Modell zur Biochemie der Steroidrezeptoren

Nicht an Plasmaproteine gebundene Steroidmoleküle werden zunächst durch die Zellmembran in die Zellen transportiert. Dort erfolgt die Bindung an zytoplasmatische Rezeptoren mit hoher Affinität und Spezifität zu den Steroiden. Nach der Formel



(23) wobei R den Rezeptor und S das Steroid darstellen, kommt es zur Bildung des primären Komplexes RS, der in den sekundären Komplex (RS) transformiert wird. Dieser sekundäre Komplex wird in den Zellkern transloziert, und induziert die Transkription spezifischer DNA-Segmente. Es entstehen m-RNA-Moleküle, welche durch Translation an den Ribosomen des Zytoplasmas zum Aufbau bestimmter Proteine führen (3).

Steroidrezeptoren sind makromolekulare Proteine mit einem Phosphor- und einem Kohlenhydratanteil (11 , 21). Die Stabilität der Moleküle ist gering, es kommt daher bei Zimmertemperatur in Gewebeproben innerhalb von Stunden zur Inaktivierung. Lediglich in flüssigem Stickstoff können die Rezeptoren über lange Zeit stabil gehalten werden (3).

1.3. Klinische Bedeutung der Steroidrezeptoren

Mammakarzinome im metastasierten Stadium, in denen gleichzeitig Östrogen- und Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden können, zeigen nach hormoneller Therapie eine Remissionsrate von 70-80%. Im Vergleich dazu liegen bei rezeptornegativen Tumoren die therapeutischen Erfolge nur bei 5-11%. Dabei ha-

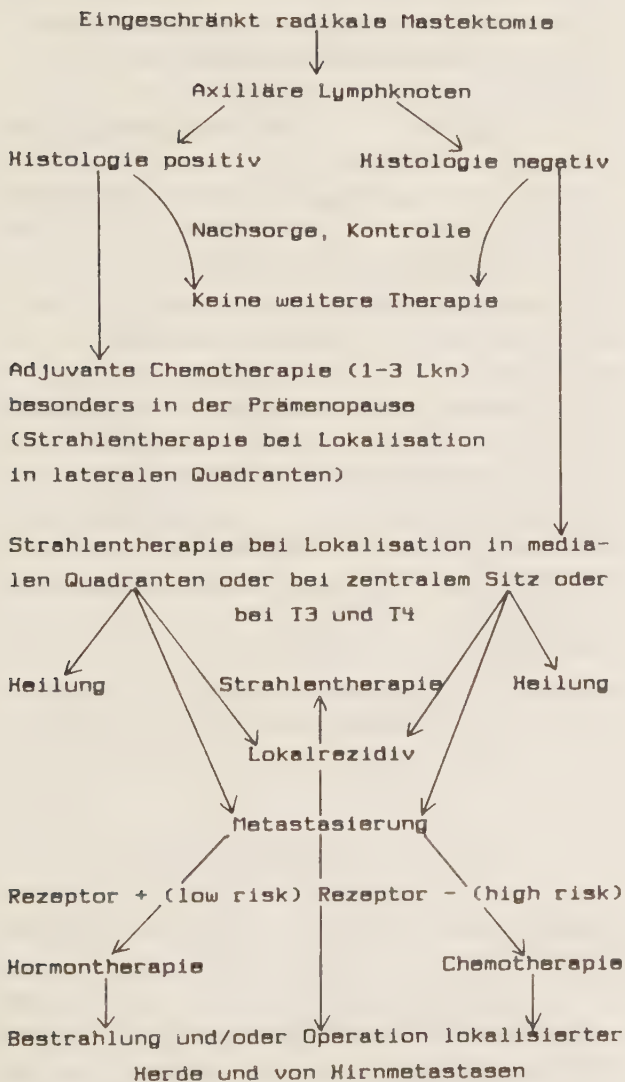
ben die Progesteronrezeptoren prognostisch wahrscheinlich eine größere Bedeutung als die Östrogenrezeptoren.

Die heute übliche Therapie ist in Abbildung 2 kurz dargestellt. Als Prognosakriterium ist dabei neben der Dauer des rezidivfreien Intervalls, dem Metastasierungstyp und dem Karnofsky-Index (Aktivitätsindex) der Hormonrezeptorstatus im Tumor von entscheidender Bedeutung:

Östrogen- und Progesteronrezeptor positiv -
"low risk".

Östrogen- und Progesteronrezeptor negativ -
"high risk".

Abb 2 ALLGEMEINES THERAPIEPROGRAMM
(nach Sauer/Wilmans 1985)



2. Ziele dieser Arbeit

Nach den Ergebnissen der Steroidrezeptoranalysen richtet sich nun seit mehr als 10 Jahren die Therapie von Mammakarzinomen. Die Erfolge dieser endokrinen Therapie sind unbestreitbar, wobei zu deren Erklärung bisher das oben beschriebene Rezeptormodell diente. Nun erschienen in jüngster Zeit einige Arbeiten, welche das Modell und insbesondere die Translokation des Rezeptors in den Zellkern in Frage stellen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Mammakarzinome, für welche die endokrine Therapie nach dem Rezeptorstatus von großer Bedeutung ist, hinsichtlich der Zytoplasma- und Kernrezeptoren für Progesteron zu untersuchen. Anhand der Resultate soll schließlich festgestellt werden, ob eine Translokation des meßbaren zytoplasmatischen Rezeptors in den Zellkern erfolgt oder nicht. Im zweiten Fall wären die oben erwähnten Arbeiten für das Mammakarzinom bestätigt.

Parallel zu dieser Arbeit wird dieselbe Untersuchung für Östrogenrezeptoren von der Doktorandin Angelika Stangl durchgeführt.

3. Beschreibung der angewandten Bestimmungsmethode für Steroidrezeptoren

3.1. Herstellung der benötigten Chemikalien

3.1.1. Homogenisationspuffer

10 mM Tris-HCl pH 7,4

1,5 mM EDTA

5 mM Monothioglycerol

Temperatur 4 Grad Celsius

Monothioglycerol dient als Stabilisator.

3.1.2. Kernextraktionspuffer

20 mM Tris-HCl pH 8,5

0,6 M KCl

5 mM Monothioglycerol

10 % Glycerin

Temperatur 4 Grad Celsius

3.1.2. Testlösung für Proteinbestimmung

1 ml 1% CuSO₄

1 ml 2% K-Na-Tartrat

100 ml 2% Na₂CO₃

in 0,1 n NaOH

3.1.3. Dextran-Aktivkohlesuspension

In 1 l aqua bidest werden 6 g Aktivkohle gerührt. Nach der Sedimentation saugt man den Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe ab und entfernt mit einem Löschblatt noch am Gefäß festhaftende Partikel. Nach Wiederholung dieses Vorganges wäscht man anschließend in der

selben Weise mit Tris-Puffer. Auf das dritte Sediment gibt man Dextranlösung, füllt mit Puffer bis zu 1 l auf, und rührt anschließend noch etwa 1 Stunde lang bei 4 Grad Celsius.

0,5% Aktivkohle

0,05% Dextran

in 10 mM Tris-HCl pH 7,4

3.2. Aufbereitung der Proben

3.2.1. Gewinnung des Zytosols

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Gewebeproben werden mit einem Skalpell so fein wie möglich zerschnitten. 1 g davon gibt man mit etwa 5 ml Homogenisationspuffer in ein Röhrchen, welches in einem mit Eis gefüllten Becherglas steht. Mit einem Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel) wird der Inhalt durch 3-4 etwa 10 Sekunden dauernde Impulse homogenisiert, mit kurzen Pausen zwischen den einzelnen Impulsen, um ein zu starkes Erwärmen der Probe zu vermeiden.

Anschließend wird das Homogenat in einem Festwinkelrotor (Fa. Kontron TFI 65.13) 30 min lang bei 4 Grad Celsius und 65000 Umdrehungen/min ultrazentrifugiert. Der Überstand, das Zytosol, kann nun abgesaugt werden, dabei muß bisweilen eine aufliegende Fettschicht durchstoßen werden.

3.2.2. Gewinnung des Kernextraktes

Das Homogenat wird unter Kühlung 15 min lang

bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert. Zu dem entstandenen Sediment gibt man etwa die 5-fache Menge Homogenisationspuffer, resuspendiert und zentrifugiert erneut für 15 min bei 2500 Umdrehungen/min. Der Vorgang wird insgesamt 3 mal wiederholt. Beim 4. Mal wird statt des Homogenisationspuffers der Extraktionspuffer zugesetzt. 45 min lang wird nun alle 15 min resuspendiert und schließlich die Suspension bei 4 Grad Celsius und 65000 Umdrehungen/min ultrazentrifugiert. Der Überstand stellt den Kernextrakt dar, der ebenso weiterverarbeitet wird wie das Zytosol (vgl. 3.2.1.)

3.2.3. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration des Zytosols bzw. des Kernextraktes dient als Bezugswert für die quantitative Angabe der jeweiligen Rezeptorkonzentration. Die Bestimmung des Eiweißgehaltes der Proben wird nach der Methode von Lowry durchgeführt (16).

Die Eichkurve bildet man mit Hilfe von Standardlösungen aus Albumin-Globulin Gemischen des Menschen mit den Konzentrationen:

1 mg/ml; 2 mg/ml; 4 mg/ml.

Der Homogenisationspuffer dient dabei als Leerwert.

Zu 0,02 ml des Zytosols bzw. des Kernextraktes pipettiert man 1 ml der Testlösung (vgl. 3.1.2.) und 0,1 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent. Nach kurzem Schütteln inkubiert man 30 min lang bei Zimmertemperatur. Anschließend wird die Extinktion der Proben in einem Photometer bei 546 nm Wellenlänge gemessen.

Die erhaltenen Werte sollten zwischen 1 und 5 mg/ml liegen, da nur in diesem Bereich optimale Reaktionsbedingungen gegeben sind. Bei zu hohen Konzentrationen kann man mit Pufferlösung nachverdünnen.

3.3. DCC Assay

Beim DCC Assay (dextran coated charcoal A.) inkubiert man Zytosol bzw. Kernextrakt mit einer Konzentrationsreihe eines ^3H -markierten Steroids.

Als Liganden für die Bestimmung des Progesteronrezeptors wird ^3H -R5020 (Fa. NEN NET 555) und unmarkiertes R5020 (Fa. NEN NLP 004) verwendet.

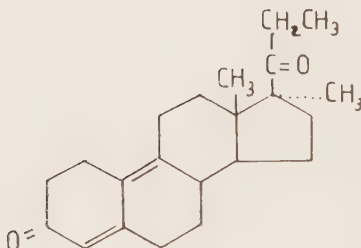


Abb 3 Struktur des R5020

Die Verdünnungsreihe des markierten Gestagens soll folgende Konzentrationen besitzen: 0,5, 1, 2, 4, 8 nM.

Damit ist es möglich, die Gesamtbindung des Steroids zu bestimmen, d.h. unspezifische wie spezifische Bindung. Da es bisher noch keinen Liganden gibt, der selektiv die gewünschten Steroidrezeptoren besetzt, bindet das 3H-R5020 ebenso an andere unspezifische Bindungsstellen, so z.B. Albumin, CBG, usw. Um nun ausschließlich die spezifischen Rezeptoren messen zu können, inkubiert man eine Verdünnungsreihe mit einem Überschuß an unmarkiertem R5020, 1600 nM, welches mit hoher Selektivität an den spezifischen Rezeptor bindet. Das 3H-R5020 kann hier nur noch unspezifische Bindungsstellen besetzen, deren Konzentration von der Gesamtbindung schließlich abgezogen werden kann. Die noch freien Hormone werden durch Adsorption an dextranbeschichtete Aktivkohle abgetrennt. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wird in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3.3.1. Herstellung der Verdünnungsreihen des Gestagens

3.3.1.1. 3H-R5020

Von dem Originalpräparat des markierten Liganden wird eine 800 nM Stocklösung hergestellt, bezogen auf 0,2 ml Zytosol bzw. Kernextrakt, und in 0,1 ml absoluten EtOH einpipettiert. Daraus ergibt sich die folgende Umrechnung (12):

$800 \text{ nmol/l Zytosol} = 800 \text{ nmol}/5000 * 0,2 \text{ ml}$
 $\text{Zytosol} = 0,16 \text{ nmol}/0,2 \text{ ml Zytosol} = 0,16$
 $\text{nmol}/0,1 \text{ ml EtOH} = 1,6 \text{ nmol/ml EtOH}$

Die Verdünnung des 3K-R5020 läßt sich damit
wie folgt berechnen:

Spezifische Aktivität: 87 Ci/mmol

Konzentration: 1 mCi/ml

$800 \text{ nM Stock: } 1,6 \text{ nmol/ml EtOH}$

$1 \text{ nmol (Originalpräparat)} = 87 \mu\text{Ci}$

$1,6 \text{ nmol} = 139,2 \mu\text{Ci}$

Verdünnung: $1000/139,2 = 7,2$

bezogen auf $1 \text{ ml Ausgangsmenge: } (1 \text{ ml} * 7,2)$
 $- 1 = 6,2 \text{ ml}$

Um die 800 nM Stocklösung zu erhalten muß
man also zu 1 ml des Originalpräparates $6,2$
 ml EtOH zugeben. Durch weiteres Verdünnen
mit Ethanol erhält man dann die gewünschten
Konzentrationen:

$8, 4, 2, 1, 0.5 \text{ nM}$

3.3.1.1.1. Bestimmung der Konzentrationspunk- te

Von der hergestellten Verdünnungsreihe wer-
den je $0,1 \text{ ml}$ mit 3 ml Szintilationscocktail
(vgl. 3.3.4.) vermischt und im Flüssigkeits-
szintilationszähler gemessen (vgl. 3.3.4.).
Die Meßwerte werden mit Hilfe des Probenfak-
tors (vgl. 3.3.5.) in Steroidkonzentrationen
umgerechnet. Zum einen dient dies dazu, die
Qualität der Verdünnungsreihe zu überprüfen,
zum anderen um die Konzentrationspunkte des
Hormons, die für die mathematische Auswer-
tung nötig sind zu erhalten. Schließlich er-
hält man dadurch die maximal möglichen Re-
zeptorkonzentrationen.

3.3.1.2. R5020

Für das unmarkierte Steroid, das in einem 1600 nM Überschuß zugegeben wird, gilt demnach folgende Umrechnung (12):

$1600 \text{ nmol/l Zytosol} = 1600 \text{ nmol/5000} \cdot 0,2$
 $\text{ml Zytosol} = 0,32 \text{ nmol/0,2 ml Zytosol} = 0,32$
 $\text{nmol/0,1 ml EtOH} = 3,2 \text{ nmol/ml EtOH}$

Damit gilt für die Verdünnung:

MG: 326,0

$1600 \text{ nM} = 3,2 \text{ nmol/ml EtOH} = 1,034 \mu\text{g/ml}$
EtOH

In 0,5 ml Ethanol und 0,5 ml Pyridin werden 20 mg des Originalpräparates gelöst und 19000 fach verdünnt.

Alle beschriebene Umrechnungen gelten analog für den Kernextrakt.

3.3.2. Herstellung der Inkubationsgemische

Für jede Patientin werden 15 Glasröhrchen vorbereitet. In die ersten 5 pipettiert man je 0,1 ml der Verdünnungsreihe des markierten Steroids von 0,5 nM bis 8 nM und zusätzlich 0,1 ml der fertigen Verdünnung des unmarkierten Hormons. In die nächsten 5 und die darauffolgenden 5 gibt man jeweils nur 0,1 ml der Verdünnungsreihe. Im Hochvakuum bei 4 Grad Celsius wird das Ethanol verdampft, und die Steroide dadurch an die Wandung der Glasröhrchen adsorbiert. Im nächsten Schritt werden vom Zytosol bzw. Kernextrakt in jedes Röhrchen 0,2 ml einpipettiert. Die Steroide gehen dabei nach kurzem Schütteln wieder in Lösung. Anschließend läßt man

die Gemische für 15 Stunden bei 4 Grad Celsius inkubieren.

3.3.3. Trennung von gebundenem und freiem Steroid

Die hier beschriebene Kohletrennung wird von der E.O.R.I.C. empfohlen (7).

Um die freien Steroide von den an Proteine gebundenen abzutrennen, gibt man zu den 0,2 ml der Proben jeweils 0,5 ml der Dextran-Aktivkohlesuspension (vgl. 3.1.3.). Dieses Gemisch läßt man 10 min bei 4 Grad Celsius stehen, und zentrifugiert anschließend 10 min lang bei 3000 Umdrehungen/min ebenfalls bei 4 Grad Celsius.

3.3.4. Messung der Radioaktivität

Von dem bei der Kohletrennung gewonnenen Überstand werden 0,45 ml abgehoben, mit 3 ml Szintilationscocktail (Fa. Beckmann 'ready solv TM KP') vermischt, und die Aktivität in einem Flüssigkeitsszintilationszähler (Fa. Beckmann LS 7500) gemessen. Die Meßwerte der Verdünnungsreihen ohne unmarkierte Steroide entsprechen dabei der Gesamtbindung, diejenigen der Reihe mit unmarkiertem Hormon der unspezifischen Bindung.

Die Radioaktivität wird in Zählraten (dpm) gemessen.

3.3.5. Berechnung der Konzentrationen aus den Zählraten

Jede Zählrate, in dpm, entspricht einer Konzentration des markierten Hormons. Um die Konzentration aus diesen Zählraten zu berechnen benötigt man für das 3H-R5020 einen Umrechnungsfaktor. Die Herleitung dieses Faktors sei im Folgenden kurz beschrieben (12) (vgl. 3.3.1.1.):

$$1 \text{ nmol/l} = 1 \text{ pmol/ml} = 0,2 \text{ pmol/0,2 ml}$$

$$1 \text{ pmol} = 87 \text{ nCi}$$

$$0,2 \text{ pmol} = 17,4 \text{ nCi}$$

$$17,4 \text{ nCi} = 3,9 \cdot 10^4 \text{ dpm}$$

$$\text{also: } 1 \text{ nM} = 3,9 \cdot 10^4 \text{ dpm}$$

$$2,6 \cdot 10^{-5} \text{ nM} = 1 \text{ dpm}$$

$$\text{Faktor Standard: } 2,6 \cdot 10^{-5} \text{ (nM)}$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor Probe: } & 2,6 \cdot 10^{-5} \cdot 0,7/0,45 = \\ & 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ (nM)} \end{aligned}$$

4. Mathematische Auswertung der Analysen

Die Ergebnisse des DCC Assays werden mit Hilfe des linearen Scatchard-Plots (20) mit vorgeschalteter Sättigungsanalyse ausgewertet.

4.1. Sättigungsanalyse (Abb. 4)

Bei der Sättigungsanalyse handelt es sich um ein nicht lineares 'curve fitting' Verfahren (19).

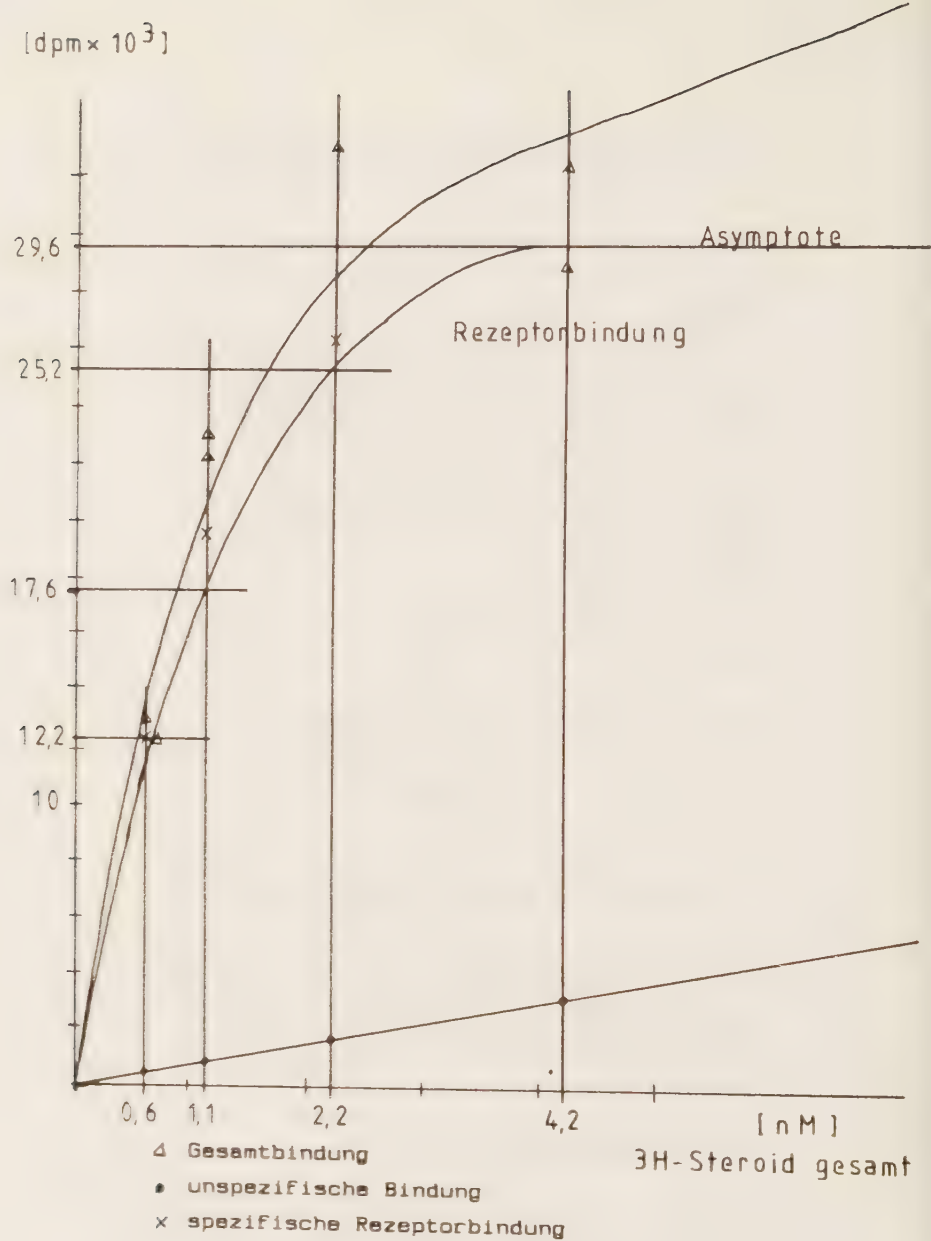


Abb 3 SÄTTIGUNGSANALYSE bei linearem
SCATCHARD-PLOT

Auf der Abszisse werden dabei die Konzentrationspunkte des radioaktiv markierten Steroids aufgetragen, auf der Ordinate die Werte für die unspezifische und die Gesamtbindung in dpm. Durch die Punkte der unspezifischen Bindung kann nun eine Gerade des Typs $y=ax$ gelegt werden, durch jene der Gesamtbindung läßt sich eine Kurve des Typs $y=y_0(1-e^{-cx}) + ax$ ziehen. Dabei ist darauf zu achten, daß in beiden Fällen die quadratische Abweichung der Einzelpunkte ein Minimum erreicht. Zieht man die beiden Kurven voneinander ab, so erhält man die Kurve für die spezifische Rezeptorbindung ($y=y_0(1-e^{-cx})$). Für jeden Konzentrationspunkt können nun die dpm Werte abgelesen werden, die mit dem Probenfaktor multipliziert (vgl. 3.3.5.) die Konzentration in (nM) für den spezifischen Rezeptor ergibt.

Zu den mathematischen Grundlagen seien auf die zitierten Originalarbeiten verwiesen.

4.2. Scatchard-Plot (Abb. 5)

Von jedem Konzentrationspunkt (vgl. 3.3.1.1.1.) wird der Maßwert für die spezifische Rezeptorbindung (B) subtrahiert. Daraus erhält man die Konzentration des freien, nicht gebundenen, markierten Steroids (F).

In einem kartesischen Koordinatensystem werden nun auf der Abszisse die B-Werte aufgetragen, auf der Ordinate die vorher für jeden Konzentrationspunkt errechneten B/F Werte.

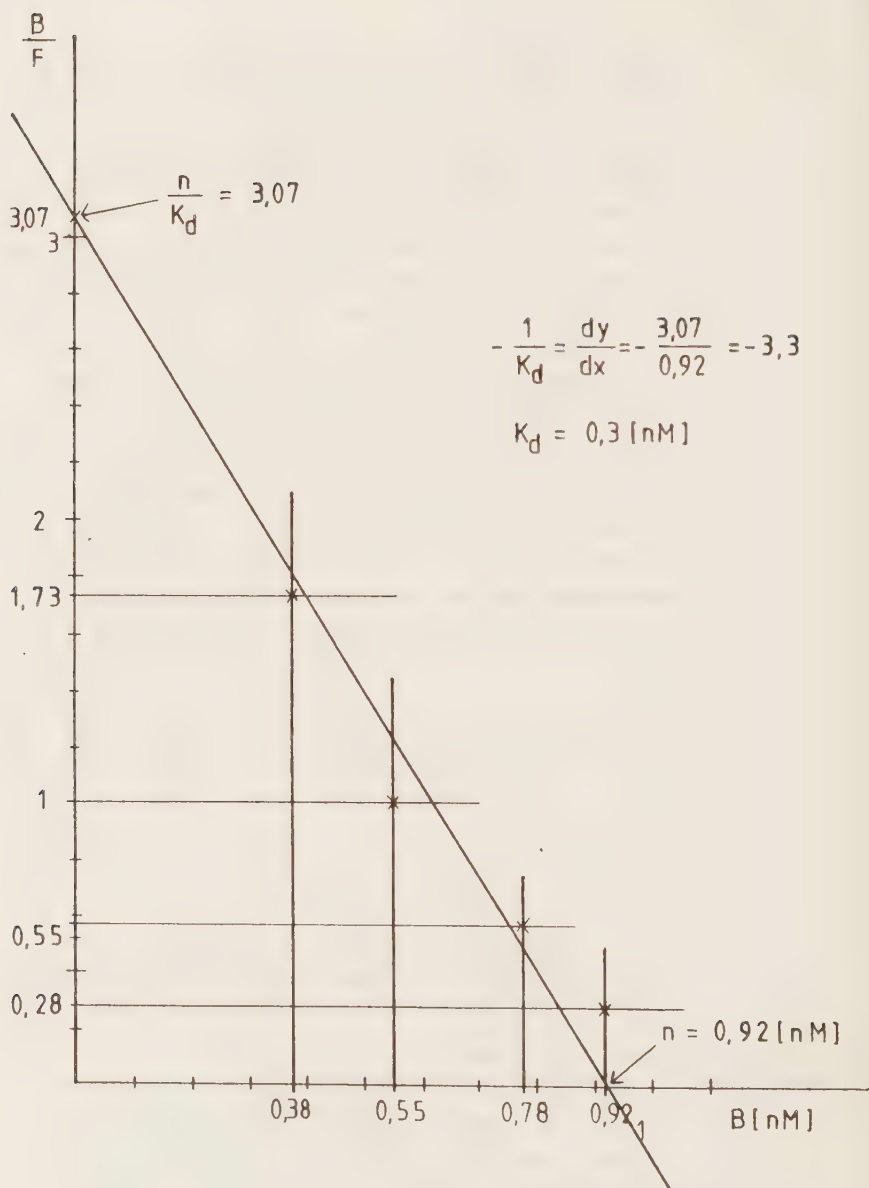


Abb 4 Linearer SCATCHARD-PLOT

Der Schnittpunkt der resultierenden Geraden (Scatchard-Gerade) mit der Abszisse ist schließlich der Wert des maximal spezifisch gebundenen 3H-Steroids und damit der Rezeptorgehalt. Die endgültige Rezeptorkonzentration erhält man durch Division des Wertes aus dem Scatchard-Plot mit der Proteinkonzentration.

Es wäre natürlich auch möglich, den Scatchard-Plot direkt mit den Werten des DCC Assays zu berechnen. Allerdings erhält man dabei eine weit größere Streuung der Einzelpunkte, und der Verlauf der Scatchard-Geraden wird unsicher. Die vorgeschaltete Sättigungsanalyse dient also zur Optimierung der Werte des DCC Assays.

5. Auswertung der erhaltenen Rezeptorkonzentrationen

Es wurden Mammakarzinomproben von insgesamt 100 Patientinnen auf Progesteronrezeptoren untersucht. Dabei kam es zu folgender Aufteilung:

Tabelle 1

Zytosol	Kern	Prozent (n=100)
+	+	15
+	-	32
-	+	12
-	-	41

Der eindeutig größte Teil der Patientinnen war also sowohl für Zytosol- wie für Kernrezeptoren negativ, und nur ein geringer Teil gleichzeitig für beide Rezeptoren positiv. Den geringsten Anteil stellten jene Frauen, bei welchen nur Kernrezeptoren nachgewiesen wurden.

Insgesamt gesehen darf man davon ausgehen, daß bei etwa 27% aller Mammakarzinome Progesteronrezeptoren zu finden sind (im Kern). Betrachtet man nur das Zytosol, so stimmen die Prozentzahlen mit 47% für rezeptorpositiv und 53% für rezeptornegativ sehr gut mit den Ergebnissen der Frauenklinik des Klinikums Großhadern überein (6).

Aufgeschlüsselt nach Prä- und Postmenopausalen Patientinnen kann die Tabelle 1 wie folgt ergänzt werden:

Tabelle 2

Prä = Prämenopause; Post = Postmenopause;
Ges = Gesamtzahl;

Zytosol	Kern	Prä	Post	Ges
+	+	5	10	15
+	-	5	27	32
-	+	2	10	12
-	-	7	34	41
Insgesamt:		19	81	100

Es waren also etwa 81% der Frauen zum Zeitpunkt der Operation in der Postmenopause und nur 19% prämenopausal. Die prozentuale Verteilung auf die 4 Möglichkeiten des Rezeptorstatus weicht dabei nicht wesentlich von der Gesamtverteilung ab (vgl. Tabelle 1). Lediglich für den Fall, bei welchem in Zytosol und Kern gleichzeitig Rezeptoren nachgewiesen werden konnten, findet man bei den jüngeren Patientinnen einen relativ höheren Anteil.

An Hand einiger Graphiken seien im Folgenden die Verteilungen der untersuchten Mammakarzinome nach Rezeptorkonzentrationen dargestellt.

5.1. Progesteronrezeptor im Zytosol positiv, im Kern negativ

Abbildung 6 zeigt die Konzentrationspunkte jener Karzinome, welche rezeptorpositiv für das Zytosol, rezeptornegativ für den Kern waren. In Tabelle 3 sind dazu die Konzentrationen, geteilt nach Prä- und Postmenopausal, aufgelistet.

Abb 6

PROGESTERON REZEPTOR

Zytosol positiv

Kern negativ

(n=32)

○ 239

× 127

Zytosol
(fmol/mg Prot)

100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

○ = prämenopausal
× = postmenopausalKern
(fmol/mg Prot)

0

Tabelle 3

Zytosol + Kern - ; (fmol/mg Protein)

Prämenopause (n=5)	Postmenopause (n=27)		
21	11	13	13
26	14	16	20
41	20	23	24
96	25	25	26
239	35	36	38
-	39	40	49
-	69	70	73
-	76	77	77
-	83	89	127

Der 0 Wert für den Kern wurde willkürlich auf der Abszisse gewählt, die Werte für die einzelnen Konzentrationen in fmol liegen auf der Ordinate.

Die Graphik zeigt eine unregelmäßige Verteilung der Werte der Progesteronrezeptoren. Dabei kann man erkennen, daß es zu Häufungen der Werte in 3 Konzentrationsbereichen kommt. Von den 32 Patientinnen liegen 14 zwischen 10 fmol und 22 fmol. Weitere 7 finden sich zwischen 35 fmol und 50 fmol und 9 zwischen 68 und 96 fmol. Der größte Teil der Frauen mit nur im Zytosol nachgewiesenen Rezeptoren hatte also Konzentrationen unter 100 fmol. Lediglich 2 fielen dabei aus der Reihe mit einmal 127 fmol und einmal 239 fmol. Werte über 240 fmol kamen nicht vor. Auch in der Altersverteilung läßt sich keine Gesetzmäßigkeit feststellen. Patientinnen in der Prä- und Postmenopause sind annähernd gleichmäßig auf die einzelnen Konzentrationen verteilt.

5.2. Progesteronrezeptor im Zytosol negativ, im Kern positiv

Betrachtet man nun den Fall, bei welchem das Zytosol rezeptornegativ war, dagegen der Kern rezeptorpositiv, so erkennt man eine zu Abbildung 6 vergleichbare Verteilung. Auf der Abszisse wurde willkürlich ein 0 Wert für das Zytosol aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentrationen für den Progesteronrezeptor im Kern. Die Punktwerte folgen hier ebenfalls keiner Regel, und die Konzentrationen liegen ausschließlich unter 100 fmol. Die Häufung der Werte ist nicht so ausgeprägt wie in Abbildung 6, trotzdem zeigt sich auch hier, daß die meisten Frauen Rezeptorkonzentrationen zwischen 10 fmol und 27 fmol aufweisen. Auch für die Altersverteilung trifft das in 5.1. Gesagte zu: Es läßt sich keine Gesetzmäßigkeit feststellen, die Verteilung ist annähernd gleichmäßig.

Tabelle 4

Zytosol - Kern + ; (fmol/mg Protein)

Prämenopause (n=2)	Postmenopause (n=10)		
11	11	14	19
34	20	22	26
-	30	46	74
-	90	-	-

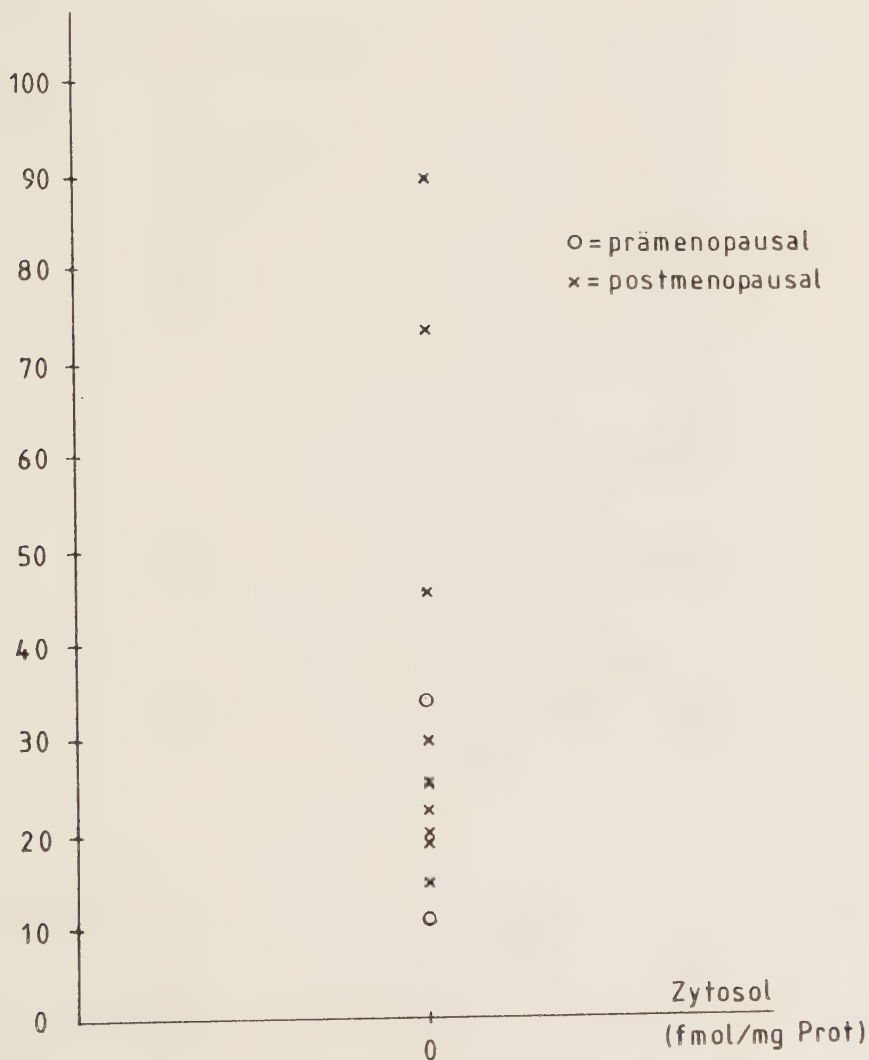
Abb 7

PROGESTERON REZEPTOR

Zytosol negativ

Kern positiv

(n=12)

Kern
(fmol/mg Prot)

5.3. Progesteronrezeptor im Zytosol positiv und im Kern positiv

Abbildung 8 zeigt schließlich die graphische Verteilung der Rezeptorkonzentrationen jener Patientinnen, welche sowohl im Zytosol als auch im Kern Rezeptoren aufwiesen. Die Konzentrationen für den Kern sind als Ordinate gegen die Abszisse mit den Konzentrationen für das Zytosol aufgetragen. Dabei lagen die Werte für das Zytosol im Bereich zwischen 151 fmol und 10 fmol, für den Kern zwischen 145 fmol und 10 fmol. Lediglich 2 Frauen fanden sich weit außerhalb dieser Grenzen, einmal mit einer Rezeptorkonzentration für das Zytosol von 475 fmol und einmal mit 915 fmol, ebenfalls im Zytosol. Die meisten Werte lagen allerdings auch hier wieder in den unteren Bereichen. Wenn man diese Graphik betrachtet, erkennt man, daß zwischen Kern und Zytosol keinerlei Beziehung besteht, weder eine lineare noch eine nicht-lineare. Ebenso sind jüngere und ältere Patientinnen, d.h. Patientinnen in Prä- und Postmenopause gleichmäßig auf die einzelnen Punkte verteilt, ohne daß sich eine besondere Gesetzmäßigkeit herauslesen ließe.

Tabelle 5

Zytosol + Kern + ; (fmol/mg Protein)

Prämenopause (n=5)		Postmenopause(n=10)	
Zytosol	Kern	Zytosol	Kern
15	17	16	11
23	14	21	19
69	10	25	20
105	103	45	16
151	64	71	11
-	-	75	33
-	-	121	25
-	-	140	90
-	-	475	45
-	-	915	139

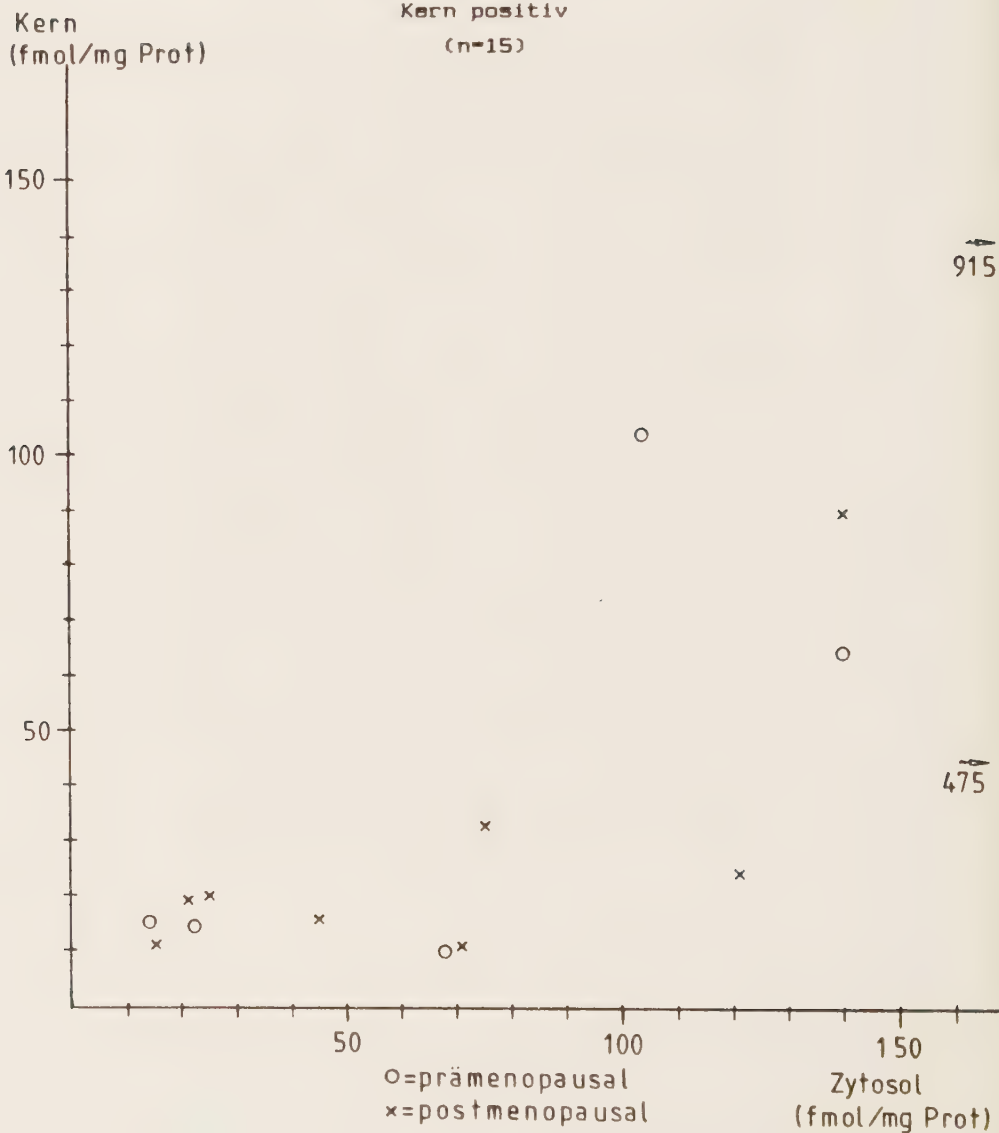
Abb 8

PROGESTERON REZEPTOR

Zytosol positiv

Kern positiv

(n=15)



6. Diskussion

Wie anfangs erwähnt, hat sich die Steroidrezeptoranalyse und die darauf aufbauende Therapie in der Behandlung des Mammakarzinoms bereits fest etabliert. Es läßt sich auch nicht von der Hand weisen, daß rezeptorpositive Patientinnen nach einer erfolgten Hormontherapie (vgl. 1.3.) eine eindeutig bessere Prognose besitzen als rezeptornegative Frauen. Bisher wurde die Wirkung der Hormone durch das eingangs beschriebene Modell erklärt, mit der Bindung des Steroids an den Rezeptor im Zytosol und dessen Translokation in den Kern. Mit dieser Arbeit sollte nun jenes Modell und besonders die Translokation in den Zellkern untersucht werden.

Zunächst ein paar Worte zur Altersverteilung der Frauen. Mit 81% in der Postmenopause und 19% in der Prämenopause lag der Schwerpunkt eindeutig bei den älteren Patientinnen. Auch bei den einzelnen Fällen des Rezeptorstatus für Zytosol und Kern ändert sich dieses Verhältnis nicht wesentlich. Ein solches Ergebnis war durchaus zu erwarten, berücksichtigt man, daß das Mammakarzinom der Krebs der älteren Frau ist.

Überraschend in der Gesamtverteilung waren dann 12 Patientinnen, die lediglich Rezeptoren im Kern aufwiesen, ein Resultat, das mit dem Rezeptormodell nicht vereinbar war. Auch ein weiteres Ergebniss der durchgeführten Rezeptoranalysen konnte mit dem beschriebenen Modell nicht erklärt werden. So erkennt man in Abbildung B (vgl. 5.3.) un-
schwer, daß es zwischen den Konzentrationen

des Progesteronrezeptors im Kern auf der Ordinate und im Zytosol auf der Abszisse keinerlei Beziehung gibt. Die Punkte liegen in dem Koordinatensystem unregelmäßig und zufällig verteilt. Nach dem Rezeptormodell jedoch sollte man eine klare Beziehung zwischen beiden Kompartimenten erwarten können, zumal Zytosol und Kern über die Translokation miteinander verbunden wären. Wenn man jedoch dazu andere Arbeiten, die sich in ähnlicher Weise mit diesem Thema beschäftigt haben, heranzieht, so werden die Resultate dieser Untersuchung durchaus bestätigt.

J. Gorski und Mitarbeiter z.B. untersuchten H 3 Zellen aus Hypophysentumoren von Ratten. Dabei fanden sie nur geringe Mengen des freien Steroidrezeptors im Zytoplasma. Der Hauptteil war dagegen im Kern lokalisiert. Gooki's Folgerung war es nun, daß sich der eigentliche Rezeptor nur im Kern befindet, der im Zytosol nachweisbare wahrscheinlich ein Extraktionsartefakt darstellt (9).

G. Greene und Mitarbeiter untersuchten Mammarkarzinomzellen des Menschen mit Hilfe monoklonaler Antikörper im Enzymimmunoassay. Es stand ihnen dabei ein ganzer Katalog von Antikörpern zur Verfügung, welche gegen verschiedene Bestandteile der Rezeptoren gerichtet waren. Dabei fanden sich die Rezeptoren, die nach Homogenisation der Zellen im Zytosol nachgewiesen werden können, bei den intakten Zellen fast ausschließlich im Kern, ganz im Gegensatz zu den Verhältnissen im Rezeptormodell (10).

Die hier gemachte Untersuchung kann damit als Bestätigung der eben beschriebenen Arbeit

ten betrachtet werden. Zumindest für die Steroidrezeptoren kann das anfangs erklärte Modell nicht mehr aufrecht erhalten werden. Es findet keine Translokation eines Steroid-Rezeptor Komplexes aus dem Zytosol in den Kern statt. Vielmehr muß angenommen werden, daß die freien Rezeptoren locker an Kernbestandteile gebunden sind. Wahrscheinlich kommt es dadurch bereits bei Abwesenheit des Steroids zu einer leichten Verschiebung des Rezeptors in das Zytosol. Besonders jedoch bei der Probenaufbereitung würden so größere Mengen des Steroidrezeptors aus dem Kern in das Zytosol übertreten. Der bisher immer wieder gemessene Zytosolrezeptor scheint also ein Extraktionsartefakt darzustellen. Allerdings ist dieses Artefakt reproduzierbar, und die Erfahrung zeigt, daß es durchaus als Grundlage einer darauf aufbauenden, endokrinen Therapie dienen kann. Man sollte aber berücksichtigen, daß ein kleiner Teil der Patientinnen, in dieser Arbeit 12%, nur Kernrezeptoren aufweist. Bei alleiniger Bestimmung des Zytosolrezeptors würden diese Frauen vielleicht um die Möglichkeit einer Verbesserung ihrer Prognose durch eine endokrine Therapie gebracht.

Parallel zu dieser Arbeit wird dieselbe Untersuchung für Östrogenrezeptoren von der Doktorandin Angelika Stangl durchgeführt.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Progesteronrezeptoren im Zytosol von Mammakarzinomzellen und deren Translokation in den Zellkern untersucht.

In der Einleitung wird kurz auf die Geschichte der Steroidhormonrezeptoren eingegangen, deren grundlegende Biochemie skizziert, und ihre Bedeutung für die Therapie des Mammakarzinoms dargestellt. Die Einleitung schließt mit Hinweisen auf neueste Untersuchungen, wonach das Rezeptormodell falsch ist.

Im folgenden Kapitel wird die Aufbereitung der Gewebeproben und der DCC Assay beschrieben.

Inhalt des nächsten Abschnittes der Arbeit ist die mathematische Auswertung der Ergebnisse des DCC Assays durch Sättigungsanalyse und Scatchard-Plot.

An Hand mehrerer Graphiken werden im Folgenden die aus den beschriebenen Arbeitsgängen erhaltenen Resultate erklärt. Ebenso wird auf die Altersverteilung der Patientinnen, deren Mammakarzinome untersucht wurden eingegangen.

Abschließend wird noch einmal auf die klinische Bedeutung der Steroidhormonrezeptoren hingewiesen, die Altersverteilung und die graphischen Darstellungen diskutiert, und diese Arbeit mit jüngsten Untersuchungen verglichen, die sich in ähnlicher Weise mit diesem Thema beschäftigt haben. Daraus werden dann die Schlußfolgerungen bezüglich des eingangs beschriebenen Rezeptormodells gezogen.

7. Literaturverzeichnis

1. CLARK, J. H., PECK, E. J.
Female sex steroids. Receptors and function.
Springer Berlin, 4-36 (1979)
2. COOKE, T., GEORGE, W. D., GRIFFITHS, K.
Possible tests for selection of adjuvant systemic therapy in early cancer of the breast.
Br. J. Surg. 67 (1980), 747-750
3. DAXENBICHLER, G., GRILL, H. J.
Steroid-Hormon-Rezeptoren: Grundlagen und Bestimmungsmethoden.
Berichte der DGKV 3, 73-79 (1980)
4. EHRLICH, P.
Chemotherapeutics: Scientific principles, methods, and results.
Lancet II, 445-451 (1913)
5. EIERMANN, W., EICHER, W.
Die endokrine Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms unter Berücksichtigung der Steroidrezeptorenbestimmung.
Chir. Praxis 28, 21-26 (1981)
6. EIERMANN, W., JAWNY, J.
Steroidhormonrezeptoranalysen im Mammakarzinom
Bayerisches Ärzteblatt 7, 538-544 (1982)

7. E. O. R. I. C. Breast cancer cooperativ group: Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer
Europ. J. Cancer 9, 379-381 (1973)
8. GLASCOCK, R. F., HOEKSTRA, W. G.
Selective accumulation of tritium-labeled hexosterol by the reproductive organs of immature female goats and sheep.
Biochem. J. 72, 673-682 (1959)
9. GORSKI, J., LIEBERMANN, M. E., WELSHONS, W. U.
Nuclear localisation of unoccupied oestrogen receptors.
Nature vol. 307, 747-749 (Feb. 1984)
10. GREENE, G. L., SOBEL, N. B., KING, W. J., JENSEN, E. U.
Immunochemical studies of estrogen receptors.
J. Steroid Biochem. Vol 20, No 1, pp. 51-56, (1984)
11. HAHNEL, R., IWADDLE, E., BRINDLE, L.
The influence of enzymes on the estrogen receptors of human uterus and breastcarcinoma
Steroids 24, 489-506 (1974)

12. JAWNY, J.
Steroidhormonrezeptoren. Biochemische und mathematische Methoden zum Nachweis intrazellulärer steroidbindender Proteine.
Dissertation Universität München (1980)
13. JENSEN, E. U., JACOBSON, H. I.
Basis guides to the mechanism of estrogen action.
Rec. Prog. Horm. Res. 18, 387-414 (1962)
14. JENSEN, E. U., BLOCK, G. E., SMITH, S. KYSER, K., DE SOMBRE, E. R.
Estrogen receptors and hormone dependency
in: Estrogen target tissues and neoplasia, ed. by T. L. DAO.
University of Chicago Press 23-57 (1972)
15. JENSEN, E. U., SMITH, S., DE SOMBRE, E. R.
Hormone dependency in breast cancer.
J. Steroid Biochem. 7, 911-917 (1976)
16. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDAL, R. J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
17. MAAS, H., JONAT, W.
Steroidrezeptoren im Mammakarzinom. Bericht über ein Consensus-Meeting im National Institute of Health, Bethesda, USA
Geburts. Frauenheilk. 39, 761-764 (1979)

18. Munck, A.
General aspects of steroid hormone-receptor interaction.
in: Receptors and mechanism of action of steroid hormones, ed. by J. R. Pasqualini.
Marcel Dekker New York 1-40 (1976)
19. RODBARD, D., FELDMANN, H. A.
Theory of protein-ligand interaction
in: Methods in enzymologie Vol. XXXVI
Part A, ed. by B. W. O'Malley and J. G. Hardman, Academic Press New York 3-16
(1975)
20. SCATCHARD, G.
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949)
21. SHYMALA, G.
Is the estrogen receptor of mammary glands a metallo-protein?
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 408-415 (1975)
22. SOOST, H.-J., BAUR, S.
Gynäkologische Zytodiagnostik.
Thieme Stuttgart 4. A. 86-87 (1980)
23. STEPHENSON, R. P.
A modification of receptor theory.
Br. J. Pharmacol. 11, 379-393 (1956)

24. TOFT, D., GORSKI, J.

A receptor molecule for estrogens:
Isolation from the rat uterus and preliminary characterization.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1574-1581
(1966)

25. TUMORZENTRUM MÜNCHEN AN DEN MED. FAKULTÄTEN DER LMU-TU

Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie
und Nachsorge. Mammakarzinome (1985)

8. Lebenslauf

Peter Kurz, geboren am 1. Oktober 1958 in München, als Sohn des Lehrers Johann Kurz und seiner Frau Ilse, geb. Ziegler.

Besuch der Volksschule Zeilarn von 1964 bis 1969.

Wechsel an das neusprachliche Karl-von-Closen Gymnasium in Eggenfelden.

Dort Erlangen der Hochschulzugangsberechtigung mit Bestehen des Abiturs im Juni 1978.

Ableistung der Wehrpflicht in der General-von-Steuben Kaserne in Kemau bei Regensburg vom Juli 1978 bis zum September 1979.

Beginn des Studiums der Medizin im Studienjahr 1979/80 an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Im November 1985 Bestehen der ärztlichen Prüfung und Erlangung der Approbation als Arzt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.
H. Hepp für die Bereitstellung des Ar-
beitsplatzes in seiner Klinik

Herrn Priv. Doz. Dr. med. habil. Eiermann
für die Überlassung des Themas der Arbeit
und Frau M. Felber sowie Frau M. Waldherr
für die freundliche Unterstützung bei der
Laborarbeit

